

JP63214193

Publication date: 1988-09-06

Inventor: YOSHIGI HISAHIRO; others: 02

Applicant: SAPPORO BREWERIES LTD

Classification:

- international: C12P19/00; C12Q1/40

- european:

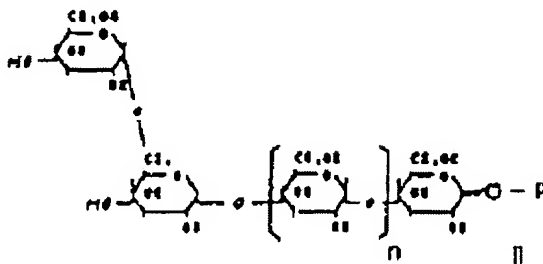
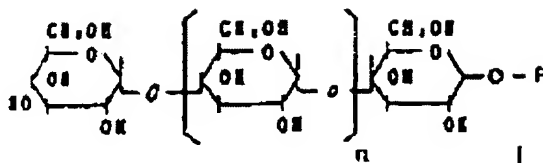
Application number: JP19870048386 19870303

Priority number(s):

Abstract of JP63214193

PURPOSE: To readily obtain a
obtain a 6-glucosylmaltooligosaccharide
derivative useful for measuring alpha-
amylase activity, such as clinical
diagnosis, by reacting a specific enzyme
with glucose or oligosaccharide and a
maltooligosaccharide derivative.

CONSTITUTION: (A) Glucose or an
oligosaccharide or aglycone thereof is
blended with (B) a maltooligosaccharide
derivative expressed by formula I [R is
(un) substituted nitrophenol residue; n is
2-5] so as to provide 0.2-5 weight ratio
(A/B) and 10-75wt.% substrate
concentration of A+B) to afford a
substrate solution (C). Oligo-1,6-
glucosidase originating from a
microorganism in an amount of 1-10
units based on 1g component (B) is then
added to the solution (C) and reacted at
20-50 deg.C and pH6-8 to form a 6-
glucosylmaltooligosaccharide derivative
(D) expressed by formula II (R and n are
same as those described above). The
resultant component (D), as necessary,
is used as a substrate and a sample is
reacted with alpha-glucosidase to
measure liberated nitrophenol based
compounds and measure the alpha-
amylase activity in the sample.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-214193

⑮ Int. Cl.⁴C 12 P 19/00
C 12 Q 1/40

識別記号

庁内整理番号

7236-4B
6807-4B

⑯ 公開 昭和63年(1988)9月6日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑰ 発明の名称 6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体の製法およびそれを用いるα-アミラーゼ活性測定法

⑱ 特 願 昭62-48386

⑲ 出 願 昭62(1987)3月3日

⑳ 発 明 者 吉 儀 尚 浩 静岡県焼津市塩津278-2
 ㉑ 発 明 者 山 本 久 夫 静岡県焼津市塩津278-2
 ㉒ 発 明 者 上 村 稔 静岡県焼津市小川一丁目514-2
 ㉓ 出 願 人 サツポロビール株式会社 東京都中央区銀座7丁目10番1号
 ㉔ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

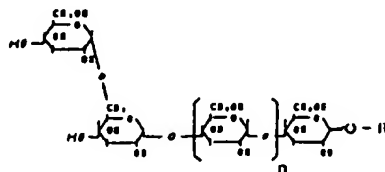
明 細 書

1. 発明の名称

6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体の製法およびそれを用いるα-アミラーゼ活性測定法

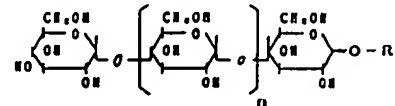
2. 特許請求の範囲

(1) グルコースもしくは少糖もしくはそれらのアグリコンとマルトオリゴ糖誘導体にオリゴ-1、6-グルコシダーゼを作用させることを特徴とする一般式



(式中Rは置換または未置換のニトロフェノール残基を示し、nは2～5の整数を示す。)で表わされる6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体の製法。

(2) マルトオリゴ糖誘導体が下記の構造を有するものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

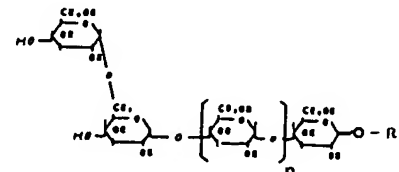


(式中Rは置換または未置換のニトロフェノール残基を示し、nは2～5の整数を示す。)

(3) マルトオリゴ糖誘導体が下記の構造を有するものである特許請求の範囲第1項記載の方法。



(4) 一般式



(式中Rは置換または未置換のニトロフェノール残基を示し、nは2～5の整数を示す。)で表わされる6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体を基質として、α-グルコシダーゼおよび/またはβ-

α-グルコシダーゼ共存下に試料を接触させ、遊離するニトロフェノール系化合物を測定することにより、試料中のα-アミラーゼ活性を測定することを特徴とするα-アミラーゼ活性の測定法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、臨床診断、生化学的研究等においてα-アミラーゼの活性を測定するために使用する試薬である6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体の製法およびそれを用いてα-アミラーゼの活性を測定する方法に関するものである。

〔従来の技術〕

尿または血液などの体液中に含まれるα-アミラーゼの活性測定は、臨床診断の場で広く実施されている。最近ヒト体液中のα-アミラーゼ活性測定用基質として、マルトオリゴ糖の還元末端端側グルコースにニトロフェノール系化合物を結合させた構造の明確な基質が合成され、次のような基質を用いるα-アミラーゼ測定試薬が提案されている。

- (a) 2, 4-ジクロロフェニル β-マルトペンタオไซด์ α-アミラーゼ 2, 4-ジクロロフェニル β-マルトサイド + マルトトリオース
- (b) 2, 4-ジクロロフェニル β-マルトサイド α-グルコシダーゼ 2, 4-ジクロロフェニル β-グルコサイド + グルコース
- (c) 2, 4-ジクロロフェニル β-グルコサイド β-グルコシダーゼ 2, 4-ジクロロフェノール + グルコース
- (d) 2, 4-ジクロロフェノール + α-アミノアシナピリン 酸化剤 キノン色素

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかし、これらのマルトオリゴ糖誘導体を使用するα-アミラーゼ測定系では、共存酵素として使用するα-グルコシダーゼが基質にも作用することから、試薬ブランク値の上昇が著しいという問題点がある。さらにα-グルコシダーゼ液と基質液との一液化は、α-グルコシダーゼの基質分解により、試薬の安定性を著しく損なうという共通の問題点があった。そこで本発明者等は鋭意研

p-ニトロフェニルマルトペンタオไซด์

〔特公昭57-53079号公報〕

p-ニトロフェニルマルトヘキサオไซด์

〔特公昭57-53079号公報〕

p-ニトロフェニルマルトヘptaオไซด์

〔特開昭54-51892号公報〕

2, 4-ジクロロフェニルマルトペンタオไซด์

〔特開昭56-35998号公報〕

これらの化合物を基質とするα-アミラーゼ活性の測定様式を例示すると次の様になる。

p-ニトロフェニル α-マルトペンタオไซด์の場合

(a) p-ニトロフェニル α-マルトペンタオไซด์ α-アミラーゼ p-ニトロフェニル α-マルトサイド + マルトトリオース

(b) p-ニトロフェニル α-マルトサイド α-グルコシダーゼ p-ニトロフェノール + グルコース

2, 4-ジクロロフェニル β-マルトペンタオไซด์の場合

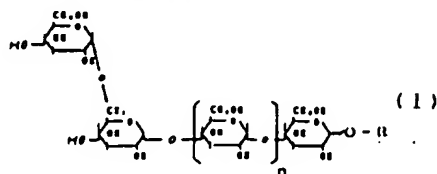
究を重ね、マルトオリゴ糖誘導体の非還元性末端グルコースにグルコースをα-1, 6結合させた6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体を用いれば、これらの問題点が解決できることを知り、本発明を完成するに至った。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的を達成することに成功した本発明は、マルトオリゴ糖の還元性末端端グルコースに、ニトロフェノール系化合物をαまたはβ結合させたマルトオリゴ糖誘導体とグルコースもしくは少糖もしくはそれらのアグリコンの混合溶液にオリゴ-1, 6-グルコシダーゼ（イソマルターゼ、EC3.2.1.10）を作用させて、マルトオリゴ糖誘導体の非還元性末端端グルコースにグルコースをα-1, 6結合させた6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体を製造する方法および当該6-グルコシルマルトオリゴ糖を基質としてα-グルコシダーゼおよび/またはβ-グルコシダーゼ共存下に試料を接触させ、遊離するニトロフェノール系化合物を測定することにより、試料中のα

α-アミラーゼ活性を測定する方法を提供するものである。

本発明の6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体は、下記の構造を有するものである。

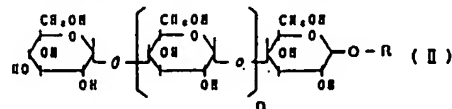


(式中Rは置換または未置換のニトロフェノール残基を示し、nは2～5の整数を示す。)ここで上記一般式(I)におけるRの具体例を示すと、例えば2-ニトロフェニル基、4-ニトロフェニル基、2,4-ジニトロフェニル基およびこれらの芳香族水素を単独あるいは複数のハロゲン基、スルホン酸基またはカルボン酸基で置換したものを挙げることができる。

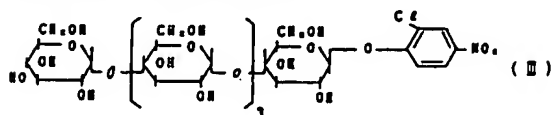
6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体は、グルコースもしくは少糖もしくはそれらのアグリコンとマルトオリゴ糖誘導体にオリゴ-1、6-グル

ルコシダーゼは動物、植物、微生物など如何なる起源のものでもよい。反応条件としては、グルコースもしくは少糖もしくはそれらのアグリコン/マルトオリゴ糖誘導体の増量比が0.2～5.0、基質濃度10～75%の溶液にオリゴ-1、6-グルコシダーゼをマルトオリゴ糖誘導体1gあたり1～10単位(酵素1単位は、イソマルトースに作用し1分間に1μmolのグルコシド結合を切断する酵素量)加え、反応温度を20～50℃、pH6～8の範囲で行えばよい。特に好ましくは、グルコースもしくは少糖もしくはそれらのアグリコン/マルトオリゴ糖誘導体の重量比が約0.5:1、基質濃度14.9%の溶液に、オリゴ-1、6-グルコシダーゼをマルトオリゴ糖誘導体1gあたり1.39単位加え、反応温度30℃、pH7付近がよい。生成した6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体は280nmの吸光度を測定することにより、高速液体クロマトグラフィーで定量的分析することができる。反応後、適当な方法、例えばゲルろ過クロマトグラフィーにより目的

コシダーゼを作用させることにより製造することができる。ここで、マルトオリゴ糖誘導体としては、下記一般(II)の構造を有するものである。



(式中Rは置換または未置換のニトロフェノール残基を示し、nは2～5の整数を示す。)なお、一般式(II)におけるRの具体例は前記一般式(I)の場合と同じである。一般式(II)の誘導体、なかでも特に下式(III)



で示される2-クロロ-4-ニトロフェニルβ-マルトペンタオサイドが好適である。マルトオリゴ糖誘導体にグルコースをα-1,6結合させて、6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体を製造するためにはオリゴ-1、6-グルコシダーゼを使用するが、ここで使用するオリゴ-1、6-グ

とする6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体を得ることができる。

次に6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体によるα-アミラーゼの測定法に関して説明する。測定時に用いるα-グルコシダーゼは動物、植物、微生物など如何なる起源のものでもよいが、特に酵母から得たものがその基質特異性の点から望ましい。すなわち、酵母起源のα-グルコシダーゼはアグリコン特異性が広く、さらにマルトトリオサイド以下のグルコサイドにはよく作用するが、マルトテトラオサイド以上のグルコサイドには作用し難く、またα-1,6結合には作用しない点で本発明の目的に適合している。β-グルコシダーゼも如何なる起源のものでもよく、例えばアーモンドから得たものが使用できる。

α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼの使用法は具体的には、

(a) α-グルコシダーゼ

(b) β-グルコシダーゼ

(c) α-グルコシダーゼおよびβ-グルコシダー

ぜ

のいずれの方法でもよい。

本発明の方法は必要によりその値添加物を加えてもよい。

本発明は6-グルコシルマルトオリゴ糖誘導体に、 α -グルコシダーゼおよび/または β -グルコシダーゼ共存下に試料を接触させ、遊離するニトロフェノール系化合物を測定することにより、試料中の α -アミラーゼ活性を測定する。ニトロフェノール系化合物の測定法としては、基質から遊離したニトロフェノール系化合物が p -ニトロフェノールや2-クロロ-4-ニトロフェノールなどの場合には、直接吸光度を測定すればよく、また吸光度変化を直接測定できない場合は、呈色試薬例えば4-アミノアンチピリンなどの化合物と酸化縮合させ、その発色強度を測定すればよい。

本発明によれば、本試薬は従来のこの種の試薬と同様、血清、尿、すい液、だ液などに含まれる α -アミラーゼの活性測定に広く使用することが

できる。

〔実施例〕

次に本発明を実施例によりさらに詳しく説明する。

実施例1

高濃度に溶解させた1.01gのイソマルトリオースと1.97gの2-クロロ-4-ニトロフェニル β -マルトペンタオサイド混合溶液(基質濃度14.9%)にバチルス セレウス (*Bacillus cereus*) NY-14のオリゴ-1、6-グルコシダーゼを2-クロロ-4-ニトロフェニル β -マルトペンタオサイド1gあたり1.39単位加え、温度は30℃、pH6.9で反応させたところ、24時間後に基質である2-クロロ-4-ニトロフェニル β -マルトペンタオサイドの20%を、2-クロロ-4-ニトロフェニル β -6-グルコシルマルトペンタオサイドに変換することができた。

反応終了後、反応液をいくつかに分け、それぞれをゲルろ過クロマトカラム(2.2×38cm

)に負荷し、水で溶出することにより2-クロロ-4-ニトロフェニル β -6⁵-グルコシルマルトペンタオサイドを精製した後、凍結乾燥して白色粉末0.35gを得た。

実施例2

試料中の α -アミラーゼ活性を、下記の試薬を用い、下記方法により測定した。

試薬：

50mM グッドバッファー pH7.0

α -グルコシダーゼ(酵母) 60U/ml

β -グルコシダーゼ(アーモンド) 7U/ml

第1表に示される基質 2mg/ml

第1表

試 薬		基 質 名
本発明	A	2-クロロ-4-ニトロフェニル β -6 ⁵ -グルコシルマルトペンタオサイド
比較例	B	2-クロロ-4-ニトロフェニル β -マルトペンタオサイド

測定法：

上記試薬3mlを取り、試薬ブランク値の経時変化を調べた。(測定波長400nm、反応温度37℃)

試料(血清)20 μ lに試薬3mlを追加し、追加後4~6分後の吸光度変化(α -アミラーゼ活性)を測定した。(測定波長400nm、反応温度37℃)

試薬ブランク値の経時変化を第2表に、血清の

吸光度変化を第3表に示す。

第2表

試 薬	本発明 A	比較例 B
反応開始時	0.0794	0.0798
10分後	0.1179	0.1433
30分後	0.1265	0.2489
60分後	0.1381	0.5459

第3表

試 薬		1分間の吸光度変化
本発明	A	0.038
比較例	B	0.050

本発明の試薬Aは試薬Bと比較して、試薬ブランク値の上昇は小さい。また、 α -アミラーゼ活性値は試薬Bの約76%になっているが、1分間の吸光度変化が0.01以上あれば測定上十分であるので、0.038という値は十分に実用上測定可能な値である。

〔発明の効果〕

本発明によれば、 α -アミラーゼ測定時に、上述のように共存酵素である α -グルコシダーゼによるブランク値の上昇を抑えることができ、また基質溶解液と α -グルコシダーゼおよび/または β -グルコシダーゼ溶解液との一液化が可能とな

り、自動分析機にもかけられるなど α -アミラーゼの活性測定法においてきわめて有用である。

特許出願人 サッポロビール株式会社

代 理 人 弁 理 士 久 保 田 藤 郎

